

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen:

102 10 427.1

Anmeldetag:

09. März 2002

Anmelder/Inhaber:

Professor Dr. Hans Konrad Müller-
Hermelink und Professor Dr. Heinz
Vollmers, Würzburg/DE.

Bezeichnung:

Humaner monoklonaler Antikörper

IPC:

C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Best Available Copy



HUMANER MONOKLONALER ANTIKÖRPER

Die Erfindung betrifft einen humanen monoklonalen Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich aufweisen, oder ein funktionelles Fragment davon. Desweiteren sieht die Erfindung Verfahren zur Herstellung des Antikörpers vor, die Verwendung des Antikörpers zur Bekämpfung von Tumoren, und ein Arzneimittel und ein Diagnostikum, welche den Antikörper enthalten.

Die derzeitigen Verfahren zur Behandlung von Krebs umfassen eine operative Entfernung des Tumors, Strahlenbehandlungen und Chemotherapie. Ein wesentlicher Nachteil jeder dieser Methoden ist darin zu sehen, daß sie nicht spezifisch auf die Tumorzellen ausgerichtet sind. So kann es bei einer operativen Entfernung beispielsweise vorkommen, daß nicht der ganze Tumor erfaßt wird, was dazu führt, daß sich ein neuer Tumor entwickelt und gegebenenfalls Metastasen gebildet werden, die sich an weiteren Stellen im Körper festsetzen. Bei der Behandlung von Tumoren mit Strahlen oder chemotherapeutischen Mitteln führt die fehlende Selektivität häufig dazu, daß auch gesunde Zellen durch die eingesetzten Mittel geschädigt werden. Die nachteilige Folge hiervon ist, daß die Dosen an Strahlung oder chemischen Wirkstoffen nicht so hoch gewählt werden können, daß sie alle Krebszellen abtöten. Ein wesentlicher Teil der heutigen Krebsforschung zielt daher darauf ab, effektivere und insbesondere selektiv wirkende Verfahren und Mittel zur Bekämpfung von Tumoren zu finden.

Wie immunologische Studien gezeigt haben, ist auch dann, wenn das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann, eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar. Diese Aktivität reicht jedoch nicht aus, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung von Tumoren ist daher, von der Immunantwort des Pa-

tienten stammende Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und therapeutisch einzusetzen.

Ein Verfahren nach dem Stand der Technik, das diesen Weg beschreibt, ist unter dem Namen Hybridoma-Technik bekannt. Es beruht auf der In-Vitro-Gewinnung von zellulären Hybriden, die durch Zellfusion von normalen Lymphocyten mit unbegrenzt lebens- u. teilungsfähigen Myelomzellen gewonnen werden. Die hierbei erzeugten Hybridom-Zellen weisen die Eigenschaften beider Elternzellen auf. Dementsprechend besitzen sie die Fähigkeit der Lymphocyten, Antikörper zu produzieren, und die Fähigkeit der Myelomzelle zur unbegrenzten Teilung und damit zur Produktion der Antikörper in großen Mengen.

15 Jede aus der Fusion resultierende Hybridzelle stellt monoklonale Anti-
körper her, dessen Spezifität von der ursprünglichen Lymphozyten-Zelle
bestimmt wird. Die Hybridom-Zellen werden vermehrt und dann diejeni-
gen selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität produzie-
ren. Die Kultivierung dieser Auswahl und deren Isolierung führt zu hoch-
spezifisch reagierenden Antikörpern, welche nur mit einer bestimmten
20 antigenen Determinante reagieren. Monoklonale Antikörper, welche
spezifisch an Antigene von Tumoren binden, eröffnen daher vielverspre-
chende Möglichkeiten für Diagnose und Therapie von Tumorzellen.

Zur Verbesserung der Verfahren und Mittel im Kampf gegen Krebs besteht daher der Bedarf an derartigen monoklonalen Antikörpern. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen humanen monoklonalen Antikörper, Verfahren zu dessen Herstellung und aus dem Antikörper abgeleitete Diagnostika und Arzneimittel anzugeben, die eine hohe Spezifität für Antigene verschiedener Tumore aufweisen und sich daher für eine tumorspezifische Therapie und Diagnose gut eignen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe hinsichtlich des monoklonalen Antikörpers dadurch gelöst, daß

- wenigstens eine variable Region der leichten und/oder der schweren Ketten substantiell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweisen.

5 Aus chemischer Sicht sind Antikörper Immunglobulin-Moleküle. Diese Moleküle weisen jeweils zwei identische leichte und zwei identische schwere Ketten auf, die durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Jede der Ketten enthält eine Region von etwa 110 Aminosäuren mit variabler Sequenz, während der verbleibende Rest jeder Kette einen Bereich mit konstanter Sequenz aufweist. Die variablen Regionen von 10 leichter und schwerer Kette ihrerseits umfassen jeweils mehrere hypervariable Regionen, welche für die Bindung der Antigene verantwortlich sind. Die spezielle Ausbildung der hypervariablen Regionen bestimmen daher die spezifischen Eigenschaften des Antikörpers.

15 Wie klinische Tests belegen, begründet die Ausbildung der genannten variablen Bereiche des erfindungsgemäßen Antikörpers gemäß der angegebenen Aminosäuren-Sequenz eine hohe spezifische Wirksamkeit gegenüber den Antigenen der untersuchten Tumorzellen. Da die auf 20 Tumorzellen auftretenden Antigene auf Normalzellen nicht vorhanden sind, zeigen vorliegende Antikörper gegenüber normalen Zellen erwartungsgemäß keine oder nur geringe Bindung.

25 Erfindungswesentlich ist die substantielle Gleichheit einer der variablen Regionen der leichten oder der schweren Ketten mit der erfindungsgemäßen Sequenz. Die substantielle Gleichheit bedeutet dabei eine überwiegende Übereinstimmung der genannten Bereiche. Geringfügige Modifikationen oder Substitutionen der Ketten sind in vorliegender Erfindung mit eingeschlossen, sofern der monoklonale Antikörper oder der 30 funktionelle Teil davon tumorspezifische Eigenschaften beibehält.

35 Tumorspezifische monoklonaler Antikörper nach dem Stand der Technik betreffen in der überwiegenden Zahl der Fälle von Mäusen hergeleitete Antikörper. Jene Antikörper weisen in nachteiliger Weise jedoch eine stark eingeschränkte Einsatzmöglichkeit auf, da Mausantikörper bei An-

wendung auf den Menschen durch dessen Immunsystem als Fremdprotein erkannt und neutralisiert werden können noch bevor sie ihre therapeutische Wirkung entfalten.

5 Die Erfindung geht demgegenüber von humanen monoklonalen Antikörpern aus, welche diese Beschränkungen bei Einsatz in der Humanmedizin nicht aufweisen. Diese Antikörper weisen Sequenzen der hypervariablen Kettenbereiche auf, die substantiell denen von menschlichem Immunglobulin entsprechen. Die Antikörper können daher nach Erkennung der Determinanten oder Epitope der ihnen entsprechenden Antigenen ungehindert an den betreffenden Zellen anbinden, ohne daß eine Abwehrreaktion des Immunsystems erfolgt. Bei einer Kopplung der erfindungsgemäßen Antikörper mit diagnostischen und therapeutischen Mitteln sind vorliegende Antikörper somit in vorteilhafter Weise zur Früherkennung und effektiven Behandlung von Tumoren unterschiedlicher Art geeignet.

Bei der Lösung der Aufgabe hinsichtlich des Herstellungsverfahrens wird vorgeschlagen, die humanen monoklonalen Antikörper vorzugsweise mittels der Hybridoma-Technik zu erzeugen. Gemäß einem Merkmal der Erfindung werden hierzu B-Lymphozyten aus einem lymphatischen Organ, vorzugsweise der Milz oder des Lymphknotens, eines Karzinom-Patienten entnommen. Diese Lymphozyten sind infolge des vorhandenen Karzinoms zur Bildung derjenigen Antikörper stimuliert, welche

20

25

speziell auf die Antigene der vorliegenden Tumorzellen reagieren.

Die Lymphozyten werden in vitro jeweils mit einer Myelom-Zelle fusioniert. Gemäß vorliegender Erfindung werden hierbei die Heteromyelomzellen HAB-1 sowie deren Subklone verwendet. Die Heteromyelomzelle HAB-1 ist spezifiziert in der Literatur: Faller, G et al., HAB-1, BrJCancer 62, 595-8 (1990). Gleichmaßen können Subklone der HAB-1-Zelle Verwendung finden, die als HAB-1.X bezeichnenbar sind. Die entstandenen Zellklone besitzen wie die originären B-Lymphozyten die Eigenschaft, Antikörper zu produzieren. Die Spezifität dieser Antikörper wird dabei durch die ursprüngliche Lymphozyten-Zelle bestimmt. In vorlie-

30

35

gendem Fall bedeutet dies, daß auch die von den Zellklonen produzierten Antikörper mit den Antigenen des speziell vorliegenden Tumors korrespondieren. Nach Selektion derjenigen Zellen, die jeweils Antikörper der gewünschten Spezifität synthetisieren, werden diese Zellen kultiviert und dabei von jeder der Hybridzellen jeweils monoklonale Antikörper in unbegrenzter Menge produziert.

Gemäß einem Merkmal der Erfindung werden bei dem vorgeschlagenen Verfahren insbesondere Lymphozyten von Patienten entnommen, die ein

- Adeno-Karzinom des Colons, des Pankreas, der Prostata, der Mamma, des Ösophagus und/oder des Mund- und Rachenraums,
- Bronchial-Karzinom

aufweisen.

Neben einer Herstellung der vorliegenden humanen monoklonalen Antikörper durch die Hybridoma-Technik schließt die Erfindung auch andere Herstellungsmethoden ein. Vorgeschlagen wird, insbesondere bei der Herstellung kleinerer funktioneller Fragmente, die direkte Synthese mittels der dem Fachmann bekannten Rekombinanten-Methode oder der Herstellung mittels der bekannten Phagenbankmethode (phage display).

Die Vermehrung erfolgt unter Anwendung der bekannten Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase chain reaction = PCR).

Das PCR-Verfahren ist dem Fachmann bekannt, beispielsweise aus dem US-Patent 4,683,195. Es dient der gezielten Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments und wird mit Vorteil dann angewandt, wenn DNA-Abschnitte nur in geringen Spuren vorliegen. Das Verfahren ermöglicht, eine bekannte DNA-Sequenz unter einer Vielzahl ähnlicher Sequenzen zu erkennen und in vitro in kurzer Zeit stark zu vermehren. Hierbei kann eine spezielle DNA-Sequenz innerhalb einer Zeitspanne von ca. 3 h etwa 100.000fach vervielfältigt werden.

Bei Anwendung des vorliegenden Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgermäßigen monoklonalen Antikörper, oder von funktionellen Fragmenten davon, wird RNA der Hybridomzellen, die tumorspezifische monoklonale Antikörper produzieren, in vitro mittels reverser Transkriptase in komplementäre doppelsträngige cDNA umkopiert. Anschließend wird die cDNA, welche funktionelle Fragmente der variablen Bereiche der leichten und schweren Ketten enthält, mittels PCR vervielfältigt. Die PCR-Produkte werden gereinigt, extrahiert und anschließend kloniert.

Der Aufbau des konstanten Bereichs der schweren Kette eines Antikörpers bestimmt dessen Isotyp und legt die Effektor-Funktion des Antikörpers fest. Bei Immunglobulin besteht die konstante Region der schweren Ketten aus einer der fünf in der Literatur mit μ , γ , δ , α oder ϵ bezeichneten Sequenzen, die konstante Region der leichten Ketten aus einer der Sequenzen κ oder λ . Der unterschiedliche Aufbau der schweren Ketten führt zu den fünf Immunglobulin-Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die Antikörper gemäß vorliegender Erfindung gehören in der Regel der Klasse IgM an, wobei sowohl leichte Ketten der Klasse λ als auch κ auftreten können. Ebenso ist eine Ausbildung des Antikörpers gemäß Klasse IgG vorgesehen.

Die Erfindung umfaßt monoklonale Antikörper als auch funktionelle Fragmente davon. Dabei ist die Funktionalität der genannten Fragmente dadurch gekennzeichnet, daß sie Eigenschaften des Antikörpers aufweisen. Diese können beispielsweise darin bestehen, daß sie eine Bindungsfähigkeit gegenüber Antigenen oder eine Spezifität für Tumorzellen besitzen, oder aufgrund des Aufbaus ihres konstanten Bereichs eine Effektor-Funktion aufweisen. Gemäß einem Merkmal der Erfindung sind insbesondere Fragmente einbezogen, welche gemäß bekannter Nomenklatur (z.B. Cell Biophysics, 22 (1993), S. 189 – 224) einer der Gruppen

V_L , V_H , F_v , F_c , F_{ab} , F_{ab}' , $F(ab')_2$

angehören. Dabei umfaßt die Gruppe

- 5
- V_L Fragmente, welche den variablen oder den variablen und konstanten Bereich der leichten Ketten einschließen
- V_H Fragmente, welche den variablen Bereich oder den variablen und den konstanten Bereich der schweren Ketten einschließen
- F_v Fragmente, welche die variablen Regionen der schweren und der leichten Ketten oder Teile davon einschließen
- F_c Fragmente, welche die konstanten Regionen der schweren Ketten oder Teile davon einschließen
- 10 F_{ab} Fragmente, welche größer als die Fragmente der Gruppe F_v sind
- F_{ab}' Fragmente, welche größer als die Fragmente der Gruppe F_{ab} sind
- $F(ab')_2$ Fragmente, welche die variablen Bereiche beider schwerer und beider leichter Ketten oder Teile davon enthalten und optional die ersten konstanten Bereiche beider schweren Ketten oder Teile davon.
- 15

20 Durch Verwendung der genannten Fragmente ist es möglich, spezielle Anforderungen für bestimmte Anwendungen zu realisieren. Eine Anpassung der Eigenschaften des Antikörpers oder dessen funktioneller Fragmente läßt sich gemäß einem Merkmal der Erfindung auch dadurch erreichen, daß einzelne Aminosäure-Gruppen substituiert und/oder hinzugefügt und/oder entfernt sind. Eingriffe dieser Art führen dazu, daß beispielsweise die Stabilität oder die Selektivität des Antikörpers bzw. dessen funktioneller Fragmente modifiziert werden, dessen globalen Eigenschaften, wie beispielsweise die Bindungsfähigkeit gegenüber Tumor-Antigenen, jedoch erhalten bleiben.

25

30 Die Antikörper bzw. deren funktionelle Fragmente gemäß vorliegender Erfindung können mit weiteren Wirkstoffen verbunden werden. Durch eine Ankopplung derartiger Substanzen werden die Anwendungsbereiche des vorliegenden Antikörpers wesentlich erweitert. Insbesondere lassen sich die humanen monoklonalen Antikörper gemäß vorliegender Erfindung hierdurch für diagnostische Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen und für therapeutische Verfahren zur Bekämpfung von Tumorzellen einsetzen.

35

Gemäß einem Merkmal der Erfindung sind insbesondere folgende Substanzen vorgesehen:

- 5
- eine radiaktive Substanz,
 - und/oder ein Farbstoff,
 - und/oder ein Enzym,
 - und/oder ein Immunotoxin,
 - und/oder ein Wachstumshemmer,

10

wobei diese Wirkstoffe

15

- zum qualitativen oder quantitativen Nachweis,
- zur Verringerung der Proliferation,
- zur Erzeugung der Apoptose
- zur Vermeidung von Metastasenbildung

von Tumorzellen dienen können.

20

Der Nachweis von Tumorzellen wird häufig mit dem Fachleuten unter dem Namen Immunoassay bekannten Verfahren geführt, dessen Grundlage die Antigen-Antikörper-Reaktion ist. Um aus dieser Reaktion quantitative Aussage gewinnen zu können, wird der Antikörper gemäß vorliegender Erfindung mit einer gut nachweisbaren Markierungssubstanz gekoppelt. Substanz und Kopplung sind dabei so gewählt, daß die immunologischen Eigenschaften der Komponenten weitgehend erhalten bleiben. Die bekanntesten Immunoassays sind Radioimmunoassay, Enzymimmunoassay und Fluoreszenzimmunoassay. Im Ergebnis ermöglichen die an die Antikörper angekoppelten diagnostischen Substanzen empfindliche und zuverlässige Verfahren zur Früherkennung von Krebs.

25

30

35

Die genannten cytotoxischen Substanzen zielen auf eine Verminderung der Lebens- oder Teilungsfähigkeit der Tumorzellen. Sie bewirken alternativ eine Unterdrückung der DNA-Synthese, Unterdrückung der Zell-

teilung, Apoptose der Zellen oder einen nicht apoptotischen Zelltod. Sie bringen damit das Wachstum von Tumorzellen zum Stillstand oder bringen Tumorzellen zum Absterben.

5 Durch Kopplung der genannten Substanzen mit den selektiv gegen Krebszellen wirksamen Antikörpern gemäß vorliegender Erfindung lassen sich somit gezielt Tumore unterschiedlicher Art wirkungsvoll bekämpfen. Die Erfindung sieht hierbei insbesondere

- 10
- die Diagnose
 - und/oder Prophylaxe
 - und/oder Therapie

folgender Tumore vor:

- 15
- Adeno-Karzinom des Colons
 - großzelligem Bronchial-Karzinom
 - duktalem Mammakarzinom
 - Adeno-Karzinom des Endometriums
 - Teratokarzinom.

20 Schließlich umfaßt vorliegende Erfindung auch ein Arzneimittel und ein Diagnostikum, die jeweils dadurch gekennzeichnet sind, daß deren Wirkstoffe den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthalten. Die genannten Mittel enthalten in der Regel weitere Zusatzstoffe, wie physiologische Lösungen, Lösungsmittel, Gly-

25 cole, Öle oder dergl. im Stand der Technik bekannte Substanzen.

METHODEN, BEISPIELE UND EINZELHEITEN

5 Antikörper CM-1

Schwere Kette (VH)

10 IGHV3-30/3-30.5*01 = VH-Region des homologen KeimbahnGens
3-30/3-30.5*01
IGHJ5*01 = IH-Region des homologen KeimbahnGens
IGHJ5*01

Aminosäure-Sequenz

15 siehe Anlage 1

DNA-Sequenz

siehe Anlage 1

20 Leichte Kette (VL)

IGLV3-25*03 = VL-Region des homologen KeimbahnGens
IGLV3-25*03
IGLJ3*01 = IL-Region des homologen KeimbahnGens
25 IGLJ3*01

Aminosäure-Sequenz

siehe Anlage 1

30 DNA-Sequenz

siehe Anlage 1

Methode 1:

Immortalisierung von Lymphozyten und Primärtestung der Antikörper

5

Zur Immortalisierung werden die Lymphozyten mit einer Variante des Heteromyeloms HAB-1 nach Standardprotokoll fusioniert und kultiviert. Kurz zusammengefaßt, Lymphozyten werden mit HAB-1 Zellen mittels PEG verschmolzen. Die Triome werden auf vier 24-Lochplatten ausgesät. Die durchschnittliche Wachstumsfrequenz beträgt 80-90%, 50% der wachsenden Klone sezernieren Immunglobuline.

10

15

Die erste Austestung der sezernierten humanen monoklonalen Antikörper erfolgt im ELISA, um den Isotyp zu ermitteln. Der nächste Test ist eine immunhistochemische Färbung auf Cryoschnitten des autologen Tumors.

Benötigte Medien:

20

- RPMI 1640 (Firma PAA) ohne Zusätze
- RPMI 1640 mit HAT-Zusatz (HAT-Supplement, Firma PAA) sowie 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin

Immortalisierung:

25

30

- HAB-1 (Fusionspartner) zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen
- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- eingefrorene Lymphozyten (aus Milz oder Lymphknoten) auftauen und zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen, ebenfalls zentrifugieren
- beide Pellets jeweils in 10 ml RPMI ohne Zusatz aufnehmen und in der Neubauer-Zählkammer zählen
- im Verhältnis von 1:2 - 1:3 HAB-1 zu Lymphozyten, fusionieren
- die Zellpellets nach dem zweiten Waschvorgang zusammen geben, mischen und 8 min bei 1500 U/min zentrifugieren

- das zuvor bei 37 °C aufgewärmte PEG (Polyethylene Glycol 1500, Firma Roche) vorsichtig tröpfelweise auf das Pellet unter leicht rotierenden Bewegungen des 50 ml Röhrchens laufen lassen
- leicht resuspendieren und dann genau 90 sek. im Wasserbad bei 37 °C rotieren lassen
- danach wir das PEG mit RPMI ohne Zusätze heraus gewaschen (zwei volle 10er Pipetten)
- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- 24-Well-Platten ausplattieren mit 1 ml pro Well RPMI mit HAT-Zusatz
- das Pellet lösen in RPMI mit HAT-Zusatz
- jeweils einen halben ml der Zellen in ein 24-Well pipettieren
- Fusionsplatten in den Brutschrank stellen
- wöchentlich Mediumwechsel mit RPMI mit HAT-Zusatz

Methode 2:

20

Molekulare Charakterisierung der Antikörper

25

30

Zur Sequenzierung der monoklonalen Antikörper wird cDNA aus gesamt RNA (RNase Kit, Quiagen) von Triomen hergestellt (M-MLV reverse transcriptase, Gibco). Anschließend werden die entsprechenden VH-Gene durch PCR-Amplifikation vervielfältigt (Taq Polymerase, MBI-Fermentas). Die PCR-Produkte werden über Gel-Elektrophorese gereinigt und extrahiert. Nach dem Klonieren der PCR-Produkte (pCR-Script Amp SK+cloning kit, Stratagene) werden die positiven Klone sequenziert (DyeDeoxy Termination cycle sequencing kit, Applied BioSystems). Die Sequenzen werden mit Hilfe von Dnasis für Windows, Genebank und V-Base Databases analysiert (Vollmers et al., 1998).

Immunhistochemische Charakterisierung

Antikörper, die mit dem autologen Tumor reagieren, werden auf einem Panel von Normalgeweben und Tumorgeweben im Immunperoxidase Test (Protokoll siehe unten) untersucht, um einen Überblick über die Reaktion des Antikörpers und die Verteilung des Antigens zu erhalten.

Antikörper, die spezifisch mit den Tumorzellen reagieren und nicht mit gesundem Gewebe, werden weiter untersucht. Zunächst auf Tumoren des gleichen Typs verschiedener Patienten, dann auf Tumoren anderer Organe und schließlich auf Normalgeweben. Eine nähere Charakterisierung des Antikörpers und des Antigens erfolgt nur, wenn das Reaktionsmuster des Antikörpers auf eine zumindest eingeschränkte Spezifität mit malignem Gewebe schließen lässt.

Immunperoxidasefärbung auf Kryoschnitten und Cytospins

- Objektträger (OT)
- OT's nach dem Schneiden mindestens 2 h trocknen lassen
- OT's 10 min in Aceton stellen
- 30 min trocknen lassen
- 3 x mit Tris-NaCl waschen und anschließend 5 min in Tris-NaCl stehen lassen
- mit 100 µl Milchpulver (3 % in PBS) absättigen für 15 - 30 min
- 3 x mit Tris-NaCl waschen
- 100 µl des jeweiligen 1. Antikörpers:
 - für negative Kontrolle RPMI
 - für positive Kontrolle CK8 1:50 mit BSA/PBS oder CAM 5.2 1:10 mit BSA/PBS (BSA 0,5 %ig in PBS)
- 30 min inkubieren lassen
- 3 x mit Tris-NaCl waschen
- 100 µl des jeweiligen 2. Antikörpers:
 - Rabbit Anti Maus Peroxidase konjugiert 70 % PBS + 30% Humanserum + 1:50 AK

→ Rabbit Anti Human IgM Peroxidase konjugiert

70 % PBS + 30 % Kaninchenserum + 1:50 AK

- 30 min inkubieren lassen
- 3 x mit Tris-NaCl waschen
- OT's 10 min in PBS stellen
- 1 DAB-Tablette und 1 H₂O₂-Tablette in 1 ml Leitungswasser lösen
- 100 µl Substrat auf die OT's pipettieren und für 10 min inkubieren lassen
- mit Aqua dest. spülen
- OT's für 5 min in Häkalaun stellen
- 15 min fließend wässern
- OT's in Aqua dest. stellen und mit Glycëringelatine eindecken

Färbungen auf kolorektalen Geweben

Kolorektale Tumorgewebe wurden gefärbt, um beurteilen zu können, auf wie vielen Karzinomen und in welcher Intensität die zu untersuchenden Antikörper eine Reaktion zeigen. Insgesamt standen hierfür 21 Tumore zur Verfügung, von denen 10 (47,6%) von weiblichen und 11 (52,4%) von männlichen Patienten stammen. Unter den 21 Präparaten sind 20 Adenokarzinome, wovon 2 zusätzlich Siegelringzellen enthalten, bei einem Tumor handelt es sich histologisch um ein Plattenepithelkarzinom, 3 Karzinome sind im Caecum, 2 im Colon sigmoideum, 5 im Rectum und 11 im Bereich des restlichen Kolons lokalisiert.

Antikörper	gefärbt	-	+	++	%
CM-1	21	2	11	8	90,5

- negatives Ergebnis
- + leichte bis mäßig positive Färbung
- ++ stark positive Färbung

Cell-Death-ELISA^{PLUS} (Firma Roche, Mannheim)

Das Ausmaß der Apoptoseinduktion durch den Antikörper CM-1 wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{plus} analysiert. Dieser Test basiert auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays, bei dem Peroxidase-konjugierte murine monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die gegen Histon- bzw. DNA-Komponenten gerichtet sind. Nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates kann dann anhand der Farbintensität des Reaktionsproduktes die Menge der vorhandenen Nukleosomen und damit die relative Anzahl apoptotischer Zellen photometrisch bestimmt werden.

Hierzu werden 100 µl einer Zellsuspension ($1.0 \times 10^6/\text{ml}$) der verschiedenen Zell-Linien mit 100 µl der unverdünnten bzw. 1:1 verdünnten Antikörperüberstände in einer 96-Well-Platte für 24h im Brutschrank bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen 10 min lang bei 200 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 200 µl Lysispuffer hinzugegeben, wodurch in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen erfolgt. Nach erneutem Zentrifugieren werden jeweils 20 µl des Überstandes in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten übertragen und dann 80 µl des Immunoreagentes (1/20 Anti-DNA-POD, 1/20 Anti-Histon Biotin, 18/20 Inkubationspuffer) hinzupipettiert. Zusätzlich wird eine im Testkit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Nachdem die Platten 2 Stunden lang bei ca. 250 rpm durchmischt worden sind, wird nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer (250 µl) 100 µl der ABTS-Lösung (1 ABTS-Tablette in 5ml Substratpuffer) in jedes Well pipettiert. Nach erneutem Durchmischen spiegelt sich dann die Intensität der antikörperinduzierten Apoptose in einem intensiven grünen Farbniederschlag wider. Die Farbintensität wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers bei $\lambda = 415 \text{ nm}$ gegen die Referenzwellenlänge von 490 nm vermessen und daraus die Intensität der antikörperinduzierten Apoptose errechnet.

Cell-Death-ELISA

Antikörper: CM-1

Zelllinie: CACO-2

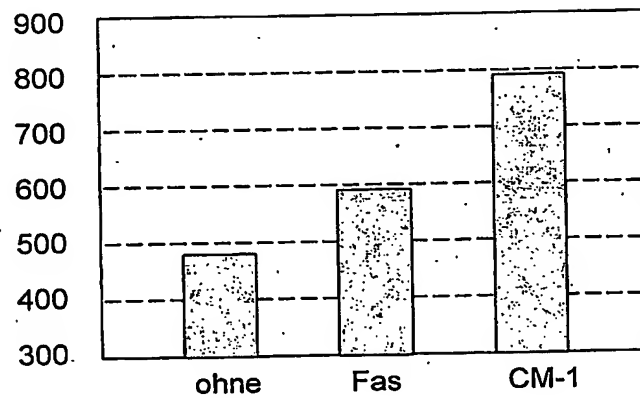
Inkubationszeit: 24h

5

10

15

20



ohne: Negativkontrolle (RPMI 1460-Medium)

CD95 Fas: 2 µg/ml positive Kontrolle (= käuflich erwerbarer AK)

CM-1: 45 µg/ml Antikörperüberstand

25

Nach 24 stündiger Inkubation zeigte der untersuchte Antikörper CM-1 im Vergleich zu den Negativkontrollen eine ausgeprägte Apoptose-Indikation, wobei der Effekt bei CM-1 den der Negativkontrolle um das 1,46 überstieg.

30

MTT-Test

- Zellen trypsinisieren und in 10 ml RPMI-Vollmedium (RPMI-1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendieren
- 5 - Zellen zählen und auf 1×10^6 Zellen pro ml verdünnen
- in eine 96-Well-Platte 50 μ l Zellsuspension pro Well pipettieren, (erste Reihe freilassen!), d.h. pro Well liegt eine Zellzahl von 5×10^4 Zellen vor
- pro Well 50 μ l Antikörper (verschiedene Verdünnungen in Vollmedium) hinzufügen
- 10 - 96-Well-Platte 24 h bzw. 48 h im Brutschrank inkubieren
- 50 μ l MTT-Lösung in jedes Well pipettieren
- Platte 20 min im Brutschrank inkubieren
- Platte anschließend 10 min bei 2800 rpm zentrifugieren und den
- 15 - Überstand absaugen
- 150 μ l DMSO pro Well hinzufügen und das Zellpellet resuspendieren
- Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm und 690 nm im ELISA-Reader bestimmen.

20

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium (SIGMA),
5mg/ml in PBS lösen.

25

MTT-TEST

Antikörper: CM-1

Zelllinie: COLO-206F (Kolon-Karzinom)

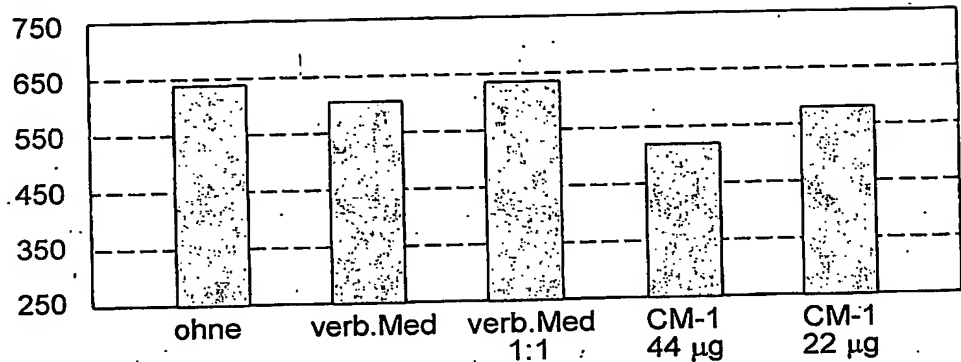
Inkubationszeit: 24h

5

10

15

20



Antikörper: CM-1

Zelllinie: COLO-206F (Kolon-Karzinom)

Inkubationszeit: 48h

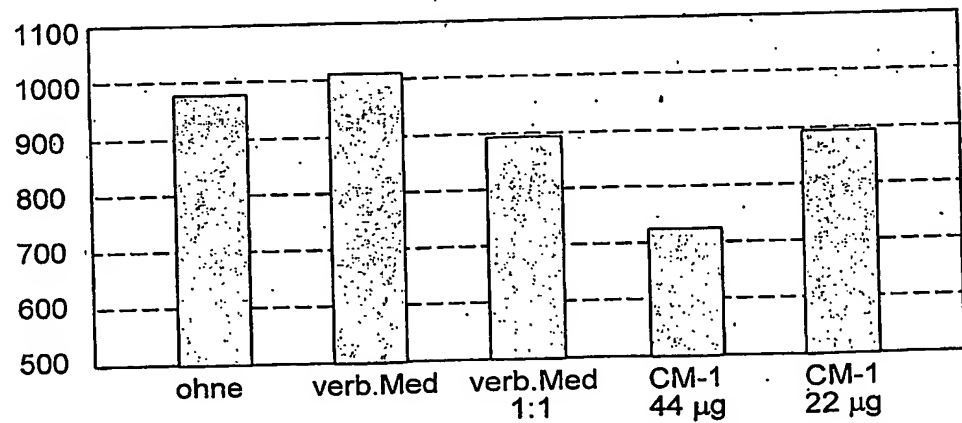
25

30

35

40

45



<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink
Professor Dr. Vollmers

<120> Humaner monoklonaler Antikörper

<141> 2002-03-09

<211> 306 bp

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220> Sequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) des Antikörpers CM-1 (Klon 101/99)

<221> V-Region

<222> (1).....(306)

<400>

agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat ggc atg cac	60
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His	
5 10 15 20	
tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga	120
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly	
25 30 35 40	
agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc	180
Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser	
45 50 55 60	
aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac	240
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
65 70 75 80	
tgt gcg aaa gac cgg tct tcg ggc tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggc acc ctg	300
Cys Ala Lys Asp Arg Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu	
85 90 95 100	
gtc acc	306
Val Thr	

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink
Professor Dr. Vollmers

<120> Humaner monoklonaler Antikörper

<141> 2002-03-09

<211> 327 bp

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220> Sequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) des Antikörpers CM-1 (Klon 101/99)

<221> V-Region

<222> (1).....(327)

<400>

```
tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag acg gcc agg atc 60
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile
      5              10              15              20

gc tct gga gat gca ttg cca aag caa tat gct tat tgg tac cag cag aag cca ggc 120
Gly Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
      25              30              35              40

cag gcc cct gtg ctg gtg ata tat aaa gac agt gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga 180
Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
      45              50              55              60

ttc tct ggc tcc agc tca ggg aca aca gtc acg ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa 240
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
      65              70              75              80

gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gca gac agc agt ggt act tat gtg gta ttc ggc 300
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Val Val Phe Gly
      85              90              95              100

gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt 327
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      105
```

20

00-03-00

PATENTANSPRÜCHE

5. 1. Humaner monoklonaler Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich aufweisen, oder funktionelles Fragment davon, **dadurch gekennzeichnet, daß**
- 10 - wenigstens eine variable Region der leichten und/oder der schweren Ketten substanziell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweist.
- 15 2. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1 mittels der Hybridoma-Technik, **dadurch gekennzeichnet, daß**
- 20 - die Hybridom-Zellen durch Fusion
- der Heteromyelomzellen HAB-1 sowie deren Subklone
- 25 - mit B-Lymphozyten gewonnen werden,
- welche aus einem lymphatischen Organ, vorzugsweise der Milz oder Lymphknoten, eines Karzinom-Patienten entnommen sind.
- 30 3. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, daß**
- die B-Lymphozyten einem Patient mit
- 35 - einem Adeno-Karzinom des Colons, des Pankreas, der Prostata, der Mamma, des Ösophagus und/oder des Mund- und Rachenraums,
- oder einem Bronchial-Karzinom entnommen sind.

4. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß**
 - er/es mittels der Rekombinanten-Methode hergestellt wird.
5. Verfahren zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers oder eines Fragmentes davon nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß**
 - er/es mittels der Gentechnologie hergestellt wird,
 - unter Anwendung von Phagenbanken (phage display-Methode).
6. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 5, **dadurch gekennzeichnet, daß**
 - der Aufbau der konstanten Region der schweren Ketten dem von Immunglobulin M oder G (IgM oder IgG) entspricht.
7. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 6, **dadurch gekennzeichnet, daß**
 - das genannte funktionelle Fragment einer der Gruppen
 - V_L
 - V_H
 - F_v
 - F_c
 - F_{ab}
 - F_{ab}'
 - $F(ab')_2$
 angehört.

5

10

15

20

25

30

35

5 8. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- einzelne Aminosäure-Gruppen
 - substituiert,
 - und/oder hinzugefügt,
 - und/oder entfernt sind.

10

15 9. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- eine erste Substanz angekoppelt ist, insbesondere
 - eine radioaktive Substanz,
 - und/oder ein Farbstoff,
 - und/oder ein Enzym,
 - und/oder ein Immunotoxin,
 - und/oder ein Wachstumshemmer.

20

25 10. Humaner monoklonaler Antikörper oder funktionelles Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 - 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß

- eine zweite Substanz angekoppelt ist, insbesondere
 - zum qualitativen oder quantitativen Nachweis,
 - zur Verringerung der Proliferation,
 - zur Erzeugung der Apoptose
 - zur Vermeidung von Metastasenbildung von Tumorzellen.

30

5

- 10

Adeno-Karzinom des Colons, des Pankreas, der Prostata,
der Mamma, des Ösophagus und/oder des Mund- und Ra-
chenraums,

- 15

- dessen Wirkstoff den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthält.

20

- dessen Wirkstoff den genannten monoklonalen Antikörper oder funktionelle Fragmente davon enthält.

ZUSAMMENFASSUNG

HUMANER MONOKLONALER ANTIKÖRPER

5

10

15

Beschrieben wird ein humaner monoklonaler Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich besitzen. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, daß wenigstens eine variable Region der leichten und/oder der schweren Ketten substanziell jeweils die in Anlage 1 wiedergegebene Aminosäure-Sequenz aufweist. Desweiteren sieht die Erfindung Verfahren zur Herstellung des Antikörpers vor, die Verwendung des Antikörpers zur Bekämpfung von Tumoren, und ein Arzneimittel und Diagnostikum, welche den Antikörper enthalten.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.